

CT/JP 99/04801

08.10.99

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

JP 99/4801

REC'D 22 OCT 1999
WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1999年 3月16日

出願番号
Application Number:

平成11年特許願第070800号

出願人
Applicant(s):

旭化成工業株式会社

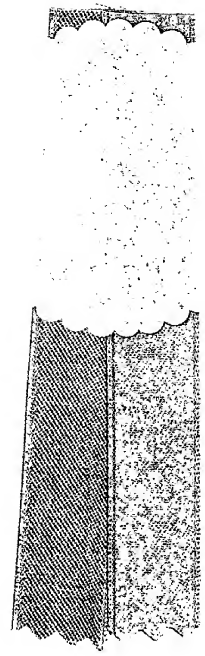
PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 8月23日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

山佐 建
特許庁長官印

出証番号 出証特平11-3058996



【書類名】 特許願

【整理番号】 X11-00077

【提出日】 平成11年 3月16日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 33/50
C12N 15/12
C07K 14/435

【発明の名称】 新規受容体蛋白 C 5 L 2 の測定方法

【請求項の数】 9

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県富士市鮫島 2 番地の 1 旭化成工業株式会社内

【氏名】 高橋 千晶

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県富士市鮫島 2 番地の 1 旭化成工業株式会社内

【氏名】 菅野 仁喜

【特許出願人】

【識別番号】 000000033

【氏名又は名称】 旭化成工業株式会社

【代表者】 山本 一元

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011187

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 受託証 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規受容体蛋白 C5L2 の測定方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ヒト白血球に存在する配列表配列番号 1 のアミノ酸配列で表される 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C5L2 の発現量を測定することを特徴とする炎症性疾患の検査方法。

【請求項 2】 炎症性疾患が慢性関節リウマチであることを特徴とする請求項 1 に記載の検査方法。

【請求項 3】 ヒト白血球がヒト顆粒球であることを特徴とする請求項 1 に記載の検査方法。

【請求項 4】 ヒト顆粒球がヒト組織から採取した顆粒球であることを特徴とした請求項 3 に記載の検査方法。

【請求項 5】 ヒト顆粒球が採取後 6 時間以上経過した顆粒球であることを特徴とする請求項 4 に記載の検査方法。

【請求項 6】 配列表配列番号 1 のアミノ酸配列で表される 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C5L2 の mRNA 量を測定することを特徴とする請求項 1 に記載の検査方法。

【請求項 7】 配列表配列番号 1 のアミノ酸配列で表される 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C5L2 の mRNA 量を RT-PCR 法で測定する事を特徴とする請求項 6 に記載の検査方法。

【請求項 8】 配列表配列番号 1 のアミノ酸配列で表される 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C5L2 またはその少なくとも 5 個のアミノ酸残基からなる部分ペプチドの蛋白質量を測定することを特徴とする請求項 1 に記載の検査方法。

【請求項 9】 配列表配列番号 1 のアミノ酸配列で表される 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C5L2 またはその少なくとも 5 個のアミノ酸残基からなる部分ペプチドに特異的に反応する抗体を用いることを特徴とする請求項 8 に記載の検査方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、炎症性疾患特に慢性関節リウマチの診断に有用な、生体中に含まれる 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C 5 L 2、またはそれを構成している部分ペプチドの測定方法に関する。また、本発明は、7 回膜貫通型受容体蛋白質 C 5 L 2 全長、またはそれを構成している部分ペプチドをコードする核酸の測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

細胞の機能、すなわちその増殖、分化、活性化、化学遊走等は細胞に発現している様々な受容体蛋白質によって制御されている。受容体とは、細胞表面に存在し、他の細胞の表面や体液中に存在するシグナル分子と高い親和性で結合し、そしてその結合という細胞外の出来事を細胞内シグナルに変換して細胞の応答を引き起こすものである（中村桂子・松原健一監修、細胞の分子生物学（第2版）、教育社、936、1990年）。

【0003】

例えば白血球の受容体としては、サイトカイン受容体ファミリー、EGF（Epidermal Growth Factor）受容体ファミリー、7回膜貫通型受容体ファミリーなど種々の受容体蛋白質が知られており（The Leucocyte Antigen Facts Book, アカデミックプレス、38-49、1993年）、その機能は多岐にわたっている。7回膜貫通型受容体蛋白質ファミリーは、このような受容体ファミリーの一つであり、G蛋白質共役型受容体（G protein-coupled receptor）、ロドプシン型受容体などとも呼ばれる。白血球においては、7回膜貫通型受容体蛋白質の研究は比較的新しく開始されており、いまだ数多くの未知の7回膜貫通型受容体蛋白質が存在すると考えられている。

【0004】

現在までに白血球に存在する7回膜貫通型受容体蛋白質として同定されたものとしては、アナフィラトキシンと結合する受容体群、ケモカインと結合する受容体群、PAF（血小板活性化因子）と結合する受容体などがある。

例えば、アナフィラトキシンの受容体は、好中球やマクロファージの機能、例えば、活性酸素の産生、化学遊走、細胞接着の活性化に関与している (Bouley, F. ら、Biochemistry 30, 2993-2999, 1991年)。ケモカインと結合する受容体群の一つ、マウスのIL-8 (インターロイキン8) 受容体ホモログの欠損マウスでは、炎症誘導物質の腹腔内投与による好中球浸潤が減少したと同時に好中球増加症、骨髓やリンパ節での顆粒球、形質細胞の増加が観察された (飯笹久、松島綱治、臨床免疫、28, 731-737, 1996年)。従って、これらの7回膜貫通型受容体蛋白質は、白血球の増殖、分化、活性化、化学遊走等を制御している。

【0005】

7回膜貫通型受容体においては、多くの場合、受容体とシグナル分子の関係は1対1に対応しているのではない。従って、疾患の治療を考えた場合にはシグナル分子を知ることだけでは不十分である。例えば、セロトニンの場合には、セロトニンという単一のシグナル分子に対し、イオンチャンネル型受容体という全く異なるシグナル伝達経路の受容体を含む14種の受容体が知られており、さらに、個々の受容体に特異的に結合する化合物も知られており (1996 Receptor & Ion Channel Nomenclature Supplement, Trends Pharmacol. Sci., 1996年)、それぞれ異なる疾患の治療への応用も考えられている。また、ケモカイン群の場合には、単一のシグナル分子が多数の受容体と反応すると同時に、単一の受容体が多数のシグナル分子と反応する例も多く知られている (C. A. Power ら、Trends Pharmacol. Sci. 17, 209-213, 1996年)。

【0006】

従って、仮に単一のシグナル分子が疾患の原因であるとしても、細胞の種類によって異なる受容体がある場合には複数存在し、疾患の原因である特定の細胞群の機能を特異的に制御する場合には、その細胞に作用するシグナル分子の特定よりもその細胞に発現している受容体を特定することが重要となる。例えば、白血球に作用するシグナル分子群ケモカイン群の場合、シグナル分子RANTES

(Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted) に対しては種々の白血球が反応するが、好酸球にはケモカイン受容体の一つCCR3が特異的に発現しており、好酸球を特異的に制御する方法を検索する際には受容体CCR3が必要となる(Howard, O. M. Z. ら、TIBTECH, 14, 46-51, 1996年)。従って、白血球に存在するケモカインリセプター群について理解を深め、あるケモカインリセプターに特異的に作用する物質が得られれば、特定の炎症反応を選択的に抑制する新しい抗炎症薬の開発に繋がる可能性がある。

【0007】

また、ケモカインは重要な診断マーカーとなる可能性がある。組織に損傷や感染などの侵襲が加わると生体は直ちに炎症反応を開始するが、侵襲の原因、期間、免疫応答などに応じてさまざまな種類の白血球が傷害を受けた組織に浸潤してくることはよく知られている。このことは、一群のケモカイン、ケモカインリセプターによって各種白血球の遊走が制御されており、特定の細胞には特異的なケモカインリセプターの発現があることを予想させる。事実、CCR5はTh1細胞、CCR4はTh2細胞に発現するという報告があり(Pius Loetscher, et al. CCR5 is characterisitic of Th1 lymphocytes : NATURE 391 344-345 1998 Bonecchi R, et al. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of T helper cells (Th1s) and Th2s. : J. Exp Med 187 129-134 1998)、抗原非特異的な炎症に続く、特異的な細胞性免疫、液性免疫反応の選択にケモカインリセプターが関与している可能性がある。従って、例えば末梢血中のケモカインリセプターの発現を解析することで、疾患やその疾患の重症度、治療経過などが診断可能になるだろう。

【0008】

主に好中球や単球に作用するCXCL及びCCケモカインは急性あるいは慢性の

炎症反応で重要な役割を果たすところから、これらはまとめて炎症性ケモカインと呼ばれている。例えば、特定の炎症性ケモカインリセプターを発現している細胞を選択的に血液から除去する体外循環医療機器は、過剰な炎症反応を抑制する即効性の治療手段を提供することになる。

【0009】

RAは、多発するびらん性関節炎を主徴とするが、同時に多臓器を傷害する原因不明の全身性炎症疾患である。寛解と増悪を繰り返しながら慢性に進行して関節の破壊と変形を来し、終局的には運動器の機能障害を呈してくる。

RA病態の原因が不明な現時点では、出来得る限り早期にRAを診断して、RA炎症を可及的速やかにかつ最大限に抑制して、非可逆的変化の出現を防止することが今日のRA治療の目標である。従来のピラミッド方式のRA治療では、非ステロイド性抗炎症剤（NSAID）のみで3～6ヶ月治療し経過観察する。しかし、この間にRAが進行して罹患関節数が増加してしまうと、疾患修飾性抗リウマチ剤（DMARD）の効果は著しく減弱し、もはや骨破壊を止めることは困難となる。RAの早期診断の目的は、初期からDMARDを使用する積極的早期治療で骨破壊の進行を抑止することである。

【0010】

RAの診断基準としては、1987年に定められたアメリカリウマチ学会（ACR）RA新分類基準がある。（Arnett FC et al: The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 31:315, 1988）。新基準は、旧基準と比較すると非常に単純化されており、しかも感度と特異度の点で旧基準より優れている。しかし、それにもかかわらずごく早期のRA診断の診断は難しいとされている。その理由として下記の項目が挙げられている。①症状の持続が6週以上のため、6週以内で骨破壊の見られる急速進行型早期RAがつかまらない。②手より足の関節が先行して発症するRAが多いことを念頭に入っていない。③リウマトイド結節（皮下結節）は早期には極めてまれである。④朝のこわばりが1時間以上も

ある早期RAは少ない。(山前邦臣 医学のあゆみ 182(9):605, 1997)

【0011】

臨床検査所見では、炎症反応である赤沈は早期RA群平均48.7mm/hrに対し非RA関節疾患群(早期、発症1年以内)28.4mm/hr、CRPは早期RA2.41mg/dl、非RA0.78mg/dlで両群間には有意差がある。しかし、これらはRAに特異的ではなく、他の膠原病などとの鑑別に役立たない。また、早期RAで赤沈が正常でもX線上骨破壊の進行する例がある。リウマトイド因子は発症1年以内の早期RAでは71%が陽性であるが、発症6週以内では59%と陽性率は低い。白血球数、赤血球数、血色素には早期RA(1年以内)と早期非RA関節疾患群の間で有意差がない。(山前邦臣 医学のあゆみ 182(9):605, 1997)

従って、RAの治療を考える場合、大きな問題の1つは有用な診断マーカーが少ないことである。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】

上記のように、慢性関節リウマチの優れた診断マーカーはいまだ発見されていない。本発明の課題は、慢性関節リウマチの診断マーカーとなる蛋白質、またはその蛋白質をコードする核酸を測定する方法を提供することにある。

【0013】

【課題を解決するための手段】

本発明は、1998年9月3日出願された出願番号特願平10-249752号の関連出願である。

新規7回膜貫通型受容体C5L2(出願番号特願平10-249752号)はケモカインリセプター様構造を持つことから、さまざまな炎症性疾患の医薬・診断・医療上の利用が考えられる。本発明者らはこのような予想のもとに、炎症性疾患の1例として慢性関節リウマチ(RA)を取り上げて解析した結果、RAの診断に7回膜貫通型受容体C5L2が有用であることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0014】

本発明は、ヒト白血球に存在する配列表配列番号1のアミノ酸配列で表される7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2の発現量を測定することを特徴とする炎症性疾患の検査方法を提供するものである。本発明は、炎症性疾患が慢性関節リウマチである上記検査方法であって、ヒト白血球がヒト顆粒球であることを特徴とする上記検査方法である。また、本発明はヒト顆粒球がヒト組織から採取した顆粒球であることを特徴とした上記検査方法であって、ヒト顆粒球が採取後6時間以上経過した顆粒球であることを特徴とする上記検査方法である。さらに本発明は、配列表配列番号1のアミノ酸配列で表される7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2のmRNA量を測定することを特徴とする検査方法であって、配列表配列番号1のアミノ酸配列で表される7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2のmRNA量をRT-PCR法で測定することを特徴とする上記検査方法に関する。

【0015】

また、本発明は、配列表配列番号1のアミノ酸配列で表される7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2またはその少なくとも5個のアミノ酸残基からなる部分ペプチドの蛋白質量を測定することを特徴とする検査方法であって、配列表配列番号1のアミノ酸配列で表される7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2またはその少なくとも5個のアミノ酸残基からなる部分ペプチドに特異的に反応する抗体を用いることを特徴とする上記検査方法に関するものである。

【0016】

以下、本発明を詳細に説明する。

配列表において、配列番号1のアミノ酸配列は、7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2のアミノ酸配列である。

また、配列表配列番号2の配列は7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2の全アミノ酸配列及びそれをコードしているDNA配列であり、配列表配列番号3の配列は7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2のmRNA配列に相当するDNA配列であり、配列表配列番号4は、そのmRNA配列に相補的なcDNA配列である。

【0017】

配列表配列番号5および6は、メラノーマの増殖に関与していると考えられる

既知の 7 回膜貫通型受容体蛋白質の配列をもとにデザインした *degenerative* PCR 法のためのプライマーの塩基配列である。

配列表配列番号 7 および 8 は、C5L2 の発現ベクターを構築する際の遺伝子増幅に用いた化学合成プライマーの塩基配列である。

【0018】

配列表配列番号 9 および 10 は、C5L2 の RT-PCR で用いられた化学合成プライマーである。配列表配列番号 11 および 12 は、G3PDH の RT-PCR で用いられた化学合成プライマーである。

なお、配列表に記載されたアミノ酸配列の左端及び右端はそれぞれアミノ基末端（以下、N 末という）及びカルボキシル基末端（以下、C 末という）であり、また塩基配列の左端及び右端はそれぞれ 5' 末端及び 3' 末端である。

【0019】

また、本発明で述べられる遺伝子操作に必要な cDNA の作製、DNA の塩基配列の決定、RT-PCR 等の一連の分子生物学的な実験は通常の実験書に記載の方法によって行うことができる。前記の通常の実験書としては、例えば *Molecular Cloning, A laboratory manual* (1989 年、Eds., Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., Cold Spring Harbor Laboratory Press) を挙げることができる。

【0020】

本発明のポリペプチドは、少なくとも配列表配列番号 1 のアミノ酸配列からなるポリペプチドを有するが、自然界で生じることが知られている生物種内変異、アレル変異等の突然変異及び人為的に作製可能な点変異による変異によって生じる改変体も、配列表配列番号 1 のポリペプチドの性質を失わない限り配列表配列番号 1 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するものとして本発明の新規化合物に含まれる。そのアミノ酸の改変、置換に関しては例えば Bennett らの特許出願 (WO 96/02645) などに詳しく記載されており、これらを参考にして作製することができ、これらの方法によって改変、置換されたポリペプチドも本発明に含まれる。

【0021】

ここで述べる白血球とは、単核球（リンパ球・単球）および顆粒球（好中球・好酸球・好塩基球）の総称であって、顆粒球とは白血球の中で、核が棒状あるいはそれにくびれができて分葉した細胞をいい、上記のように、好中球、好酸球、好塩基球から構成される。また、ここでいうヒト組織とは、血液、滑液、リンパ液を含む体液および、リンパ節、脾臓、骨髄、腸管、滑膜を含む組織および臓器を指す。また、ここで述べる採取とは、組織を体外に取り出すことをいい、例えば、血液であれば採血のことを指す。7回膜貫通型受容体とは、白血球受容体ファミリーの一つであり、G蛋白質共役型受容体（G-protein coupled receptor）、ロドプシン型受容体等とも呼ばれるものである。

【0022】

ここにおいて、用語「炎症」は非特異的および特異的の両者の防御系の反応を意味する。非特異的防御系反応は、一般に免疫学的記憶が不可能である白血球により仲介される炎症応答である。このような細胞は、マクロファージ、好酸球および好中球を包含する。非特異的反応の例は、蜂の刺創後の直ちの腫脹、バクテリアの感染部位における白血球の集まり（例えば、細菌性肺炎における肺の浸潤および膿瘍における膿の形成）を包含する。特異的防御系の反応は、抗原に対する特異的免疫系の反応である。特異的防御系反応の例は、抗原例えばウィルスに対して抗体の応答、および遅延型過敏性を包含する。炎症性疾患とはこれらの非特異的および特異的の両者の防御系機能の低下あるいは亢進により、人体に障害を与えるに至る疾患である。例えば、炎症性疾患には感染症や自己免疫疾患が含まれる。

【0023】

本来、ウィルス、細菌、寄生虫、カビなどの外部からの感染から宿主である自己を防衛するシステムである免疫系に異常をきたし、排除すべき外部からの感染を排除できずに引き起こされるような疾患を感染症といい、本来排除してはならない自己を排除する方向に免疫系がはたらくような疾患を自己免疫疾患という。自己免疫性疾患には臓器、器官特異的なものから非特異的な全身性のものまで多くの疾患が知られている。免疫調節異常は全身性紅斑性狼瘡、慢性リウマチ様関

節炎、1型糖尿病、炎症性腸疾患、胆汁性肝硬変、葡萄膜炎、多発性硬化症及び他の疾病例えばクローン病、潰瘍性大腸炎、水泡性天疱瘡、サルコイドーシス乾癬、魚鱗癬及びグレーブス眼病を含む広範囲にあることが知られている。

【0024】

RT-PCR法とは、逆転写酵素を用いてmRNAからcDNAを合成した後、耐熱性DNAポリメラーゼ、2種類の特異的プライマーを用い、温度の上下の繰り返しによって対象となる1種類以上の核酸をDNAポリメラーゼ反応とアニーリングを繰り返しながら対象を特異的に増幅反応を行わせる手法である。

増幅された核酸量から細胞中に含まれていたmRNA量を相対的に求めることができる。また、蛋白質はmRNAが翻訳されて生成されるため、mRNA量から蛋白質量を推定することができる。

【0025】

本発明者らは、配列表配列番号1のアミノ酸配列で表される7回膜貫通型受容体C5L2（以下、C5L2）が末梢血白血球で発現していることから、炎症を伴う疾患の診断に有用である可能性を予想した。そこで、まず白血球をリンパ球（T細胞、B細胞、単球）と顆粒球（好中球、好酸球）に分画して、RT-PCRで解析した結果、顆粒球に強く発現していることを見出した。次に、炎症性疾患の1つとしてRAに着目し、RA患者と健常人、合わせて30症例以上の末梢血から顆粒球を調製してRT-PCRで解析した。また、RA患者滑液および滑膜細胞についても、滑液細胞または滑膜細胞全体あるいはこれらから細胞を分画してRT-PCRによる解析を行い、C5L2が滑液においても顆粒球に強く発現していること、顆粒球をほとんど含まない滑膜組織ではほとんど発現していないことを見出した。

【0026】

また、本発明者らは、C5L2発現量がヒトから分離採取した体液または組織中で、分離採取後変化する可能性を予想した。そこで、体液として末梢血を用いて、採血直後および一定時間後に顆粒球を分画して、経時的なC5L2変化を測定し、解析を行った。

まず、健常人から血液を採取し、一部を用いて比重遠心法により顆粒球画分を

得た。残りの血液は室温にて静置し、一定時間後新鮮血同様に比重遠心法により顆粒球画分を得た。顆粒球画分は、RT-PCRにより、配列表配列番号9から12の化学合成プライマーを用いて細胞中でのmRNA量を測定した。mRNA量はPCR産物量を同一サンプル中のG3PDHのPCR産物量を100%とした相対値で求め、解析を行った結果、健康人末梢血由来顆粒球中でのC5L2のmRNA量は採血後6時間の間に急激に減少し、その後24時間後まで緩やかに減少していくことを見出した。

【0027】

一方、RA患者末梢血を同様にして解析したところ、RA患者の末梢血由来顆粒球中のC5L2のmRNA量は採血後24時間経っても減少しないことを見出した。

顆粒球画分におけるC5L2の発現は、新鮮血で非常に高いにもかかわらず、採血後保存している間に発現量が大きく減少する。このような現象はケモカインレセプターであるCCR4、CCR5では見られず、C5L2特有の現象であった。C5L2が既知のヒトアナフィラトキシンレセプターとホモロジーが高いことと合わせて考えると、C5L2のリガンドはケモカインに限らず、補体または菌体成分などである可能性もある。

【0028】

一方、ヒト末梢血の白血球における各血球の割合から（リンパ球25-33%、単球3-7%、好中球55-60%、好酸球1-3%、好塩基球0-0.7%：

生化学辞典 東京化学同人）換算すると、顆粒球画分（好中球、好酸球、好塩基球）の9割以上は好中球である。このことから、顆粒球画分における発現の制御については以下のように考えられる。

【0029】

好中球は非特異的免疫機構の一員であり接着、走化、食食、殺菌などの一連の機序により病原体（主に細菌）を生体から排除する。

成熟好中球の末梢血での血中滞留時間は10～16時間、寿命は2～3日。血中を循環しているものと血管内皮細胞壁に付着しているものは正常時にはほぼ同

数で、付着後組織に遊出する。組織に遊出したものは、口腔、消化管、肺胞などに失われたり、肝、脾、皮下などの組織でアポトーシスを起こして、マクロファージに貪食される。組織内での平均寿命は1～4日程度と考えられている。一旦組織にでたものは血中には戻らず、炎症部位に向かったものはアポトーシスが制御され寿命が長くなる。そして、細菌を貪食したものの寿命は短縮される。

【0030】

アポトーシスに陥った好中球は、走化能、食作用、形態変化、付着能、脱顆粒、活性化酸素の産生などの機能が全て低下している (Haslett, C., et al. : Apoptosis (programmed cell death) and functional changes in aging neutrophils. Modulation by inflammatory mediators. Chest 99 (Suppl 3) : 6S 1991年, Whyte, M. K., et al. : Impairment of function in aging neutrophils is associated apoptosis. J. Immunol. 150 : 5124-5134 1993年)。好中球がアポトーシスに陥ることは、活性化が持続すれば、生体にとって有害となることを自然に防御していると考えられる。

【0031】

C5L2は細胞が正常に働いている時普段から発現し、何らかの異常を察知して、感染あるいは炎症部位への遊出に作用する。すなわち、炎症部位において十分に働きうる細胞に発現していて、炎症部位に遊出、殺菌作用を示し始めることでその役目を終え、発現が低下する。

あるいは炎症に関わりなく組織に遊出し、アポトーシスを起こし始めた細胞からも消失する。採血後の血液は血管内に存在する正常な状態とは多くの点で異なる。採血後の保存により細胞活性が低下あるいはアポトーシスが誘導されることも予想される。

【0032】

顆粒球（好中球）においてC5L2は十分に働きうる細胞に常時発現していて、細胞の活性が低下すると消失すると考えるとき、リウマチ患者における発現低

下抑制は、以下のように説明できる。

炎症部位に向かった好中球はアポトーシスが制御され寿命が長くなるという報告 (Watson, R. W., et al. : Neutrophil apoptosis is modulated by endothelial transmigration and adhesion molecule engagement. J. Immunol. 158:945-953 1997年) や、非活動期のベーチェット病患者の末梢血中の好中球のアポトーシスが抑制されている (坂根 剛 岳野 光洋: 好中球 機能低下と機能亢進 医薬ジャーナル社 1998年) ことから、慢性関節リウマチ患者の末梢血中の好中球も同様にアポトーシスの抑制を受けていると考えられる。採血後のアポトーシスあるいは細胞の活性が低下するような状況下でも好中球がその活性を維持できているために、C5L2の発現量が健常人のように減少せずに、その発現が継続している。あるいは、好中球の活性が維持され続けていることにより、炎症が慢性化しているとも言えるであろう。

【0033】

一方、C5L2もその一員である7回膜貫通型受容体蛋白質には、CD97のように細胞外ドメインが可溶化し、炎症を起こしている関節の滑液など、炎症部位を取りまく体液中に安定な状態で遊離しているものも知られている (James X. Gray et al. CD97 is a Processed, Seven-Transmembrane, Heterodimeric Receptor Associated with Inflammation. J. Immunol. 157:5438-5447 1996年)。従って、例えば血液や滑液中に遊離している受容体蛋白質あるいはそれを構成する部分ペプチドからC5L2の発現量を測定することも炎症性疾患の診断には有効な手段となるであろう。

【0034】

以上のような鋭意努力の結果、我々は、採血後のC5L2発現量の変化、あるいは一定時間後の発現量を測定することが、炎症性疾患のマーカーとして有用であることを見出し、本発明を完成した。

C5L2発現量は、従来のRAマーカーが6週間の長期の観察を必要としていることや早期RAには見られない症状を用いていることなどに比して数日で測定でき、早期の診断が可能となる点で優れている。また、RA患者のみではなく、好中球の機能低下あるいは亢進が一因とされる他の炎症性疾患、例えば、パーチェット病、スウィート症候群や壊疽性膿皮症などの好中球性皮膚症、成人呼吸窮迫症候群 (adult respiratory distress syndrome; ARDS)、虚血再灌流障害、敗血症性ショック症候群、全身性炎症反応症候群 (systemic inflammatory response syndrome; SIRS)、肺炎等の診断にも応用できる。

【0035】

また、C5L2は慢性炎症性疾患のマーカーとして用いることも可能である。好中球のアポトーシスおよびそれに続くマクロファージによる貪食は、正常な免疫反応に不可欠のものであり、好中球が活性を維持し続けることは炎症の慢性化を示す指標となる。また、潰瘍性大腸炎やクローン病の様に再燃寛解を繰り返す炎症性疾患においては、疾患が活動期であるか否かを判断することもできる。

【0036】

【発明の実施の形態】

以下に発明を実施する形態について例を示すが、必ずしもこれらに限定されるものではない。

【0037】

【参考例1】

新規7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2遺伝子断片の取得

健常人末梢血1リットル分から、パフィーコートを回収し、有核細胞を37℃、5%炭酸ガス雰囲気下で14日間培養し、未成熟樹状細胞に分化させた。培地は、RPMI-1640培地に10%牛胎児血清 (FBS: Inter-gen社)、100ng/mlヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、50ng/mlヒトインターロイキン-4 (IL-4)、antimycotic-antibiotics (Gibco BRL社) を添加したものを使用した。培養は、必要に応じ新鮮培地に交換した。これにより、末梢血白血球

からの未成熟樹状細胞 1×10^7 個を得た。この細胞を 1000 rpm で 15 分の遠心後、上清を吸引・廃棄し、PBS 液 (Phosphate Buffered Saline; 大日本製薬 (株) 社製 Cat. No. 28-103-05) を 30 ml 加え懸濁後、再度同じ条件で遠心した。

【0038】

以下、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia Biotech 社製) を用い、製造者のプロトコル (Rev. 4. XV-025-00-07) 11~14 頁に従って (second column purification は行わなかった)、mRNA を抽出した。エタノール沈殿後、Molecular Cloning, A laboratory manual, 1989, Eds. (Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., Cold Spring Harbor Laboratory Press) の E5, Spectrophotometric Determination of the Amount of DNA or RNA に従って定量した。1 μ g の mRNA を用い、SuperScript Choice System for cDNA Synthesis (Life Technologies 社製) を用いて cDNA 合成を行った。プロトコル 11~17 頁 (Protocol 1 および 2) に従い、oligo (dT) プライマーを用いて 2 重鎖 (ds) DNA を合成した。その後、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿後、40 μ l の滅菌水に溶解した (これを cDNA サンプルと呼ぶ)。

【0039】

この cDNA サンプルのうち 2 μ l を用いて PCR (polymerase chain reaction) を行った。PCR は Taq ポリメラーゼ (宝酒造社製、コード R001A) を用いた。酵素に添付のバッファーを 5 μ l, 酵素に添付の dNTP mixture 4 μ l と配列表配列番号 5 に示した合成オリゴヌクレオチドおよび、配列表配列番号 6 に示した合成オリゴヌクレオチドをそれぞれ 200 pmol を加え、最終容量 50 μ l とした。

【0040】

この混合物を、TaKaRa PCR thermal Cycler 480を用いて、95℃1分、40℃2分、72℃3分を5サイクル行った後、95℃1分、50℃2分、72℃3分を25サイクル行った。このPCR産物の一部を1.5%アガロース・ゲル中で電気泳動を行い、エチジウムブロマイド（日本ジーン社製）にて染色後、紫外線下で観察し、約700bpのcDNAが増幅されていることを確認した。このバンドをゲルから切り出して GENE CLEAN II Kit（フナコシ社製）を用いて精製後、TA cloningキット（Invitrogen社製）を用いてクローニングした。

【0041】

すなわち、ベクターとしてpCR2.1 Vector（Invitrogen社製、以下pCR2.1という）を用い、ベクターと先のDNAとをそのモル比が1:3となる様に混ぜ合わせて、T4 DNAリガーゼ（Invitrogen社製）にてベクターにDNAを組み込んだ。DNAが組み込まれたベクターpCR2.1を大腸菌One Shot Competent Cells（Invitrogen社製）に遺伝子導入し、アンピシリン（Sigma社製）を50μg/ml含むL-Broth（宝酒造社製）半固型培地のプレートに蒔き、12時間程度37℃に放置し、現れてきたコロニーを無作為選択し、同濃度のアンピシリンを含むL-Broth液体培地2mlに植え付け、8時間程度37℃で震とう培養し、菌体を回収し、ウィザードミニプレップ（Promega社製）を用いて添付の説明書に従ってプラスミドを分離し、このプラスミドを制限酵素EcoRIにて消化して、約700bpのDNAが切り出されてくることで該PCR産物が組み込まれていることを確認し、確認されたクローンについて、組み込まれているcDNAの塩基配列決定を行った。

【0042】

挿入cDNA断片の塩基配列の決定は、Applied Biosystems社製の蛍光シーケンサーを用いて実施した。シーケンスサンプルの調製はPRISM, Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems社製）を用いて行なった。0.5ml容のマイクロチューブに9.5μl

の反応ストック液、 $4.0\mu\text{l}$ の $0.8\text{pmol}/\mu\text{l}$ のT7プロモータープライマー（GIBCO BRL社製）および $6.5\mu\text{l}$ の $0.16\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のシーケンス用鋳型DNAを加えて混合し、 $100\mu\text{l}$ のミネラルオイルを重層後、 96°C 30秒、 55°C 15秒および 60°C 4分を1サイクルとするPCR増幅反応を25サイクル行ない、 4°C で5分間保温した。

【0043】

反応後、 $80\mu\text{l}$ の滅菌精製水を加えて攪拌し、遠心分離後、その水層を3回のフェノール・クロロホルム抽出を行った。 $100\mu\text{l}$ の水層に $10\mu\text{l}$ の3M酢酸ナトリウム（pH5.2）および $300\mu\text{l}$ のエタノールを加えて攪拌後、室温、 $14,000\text{rpm}$ にて15分間の遠心を行い沈殿を回収した。沈殿を75%エタノールで洗浄後、真空下に2分間静置して乾燥させ、シーケンス用サンプルとした。シーケンスサンプルは、 $4\mu\text{l}$ の 10mM のEDTAを含むホルムアミドに溶解して 90°C 、2分間で変性後、水中で冷却してシーケンスに供した。

【0044】

約250のクローンについてDNA配列決定を行ったところ、1個のクローンが配列表配列番号2のDNA配列の235番目から852番目に対応する配列を有していた（両端のプライマーの配列を含まない）。GenBankリリース106.0, April, 1998年のサーチの結果、この配列は7回膜貫通型受容体群と類似していることが判明した。

【0045】

【参考例2】

新規7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2全長遺伝子の取得

ヒト胎盤組織由来のcDNAライブラリー（CLONTECH社）からプラークハイブリダイゼーションにて全長cDNAを持ったクローンの取得を行った。 10^6 個相当のプラークをMolecular Cloning, A laboratory manual (1989, Eds., Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., Cold Spring Harbor Laboratory Press)の2.109-1

11, Immobilization of bacteriophage λ plaques on nitrocellulose filters) に従ってプレートに蒔き、出現したプラークをナイロンフィルター (Hybond N+; Amersham社製) に転写し、転写したナイロンフィルターをアルカリ処理 (1.5M NaCl, 0.5M NaOHを染み込ませた濾紙上に5分間放置) し、次いで中和処理 (1.5M NaCl, 0.5M Tris-HCl (pH 7.5) を染み込ませた濾紙上に5分間放置) を2回行い、次に2×SSC溶液 (1×SSC溶液は0.15M NaCl, 15mMクエン酸pH 7.0) 中で5分間、2度振とう洗浄し風乾した。

【0046】

その後、UVクロスリンカー (フナコシ社製、モデルCL-1000) を用いて、このフィルターの紫外線照射を 1200×160 マイクロジュール/cm²で行った。このフィルターを用いて放射性同位元素³²Pにて標識されたヒト7回膜貫通型受容体蛋白質遺伝子C5L2遺伝子断片をプローブにしてハイブリダイゼーションを行った。

【0047】

放射性同位元素³²Pにて標識されたC5L2遺伝子断片プローブは以下の様に作製した。すなわち、C5L2遺伝子断片が組み込まれたベクターpCR2.1より、制限酵素EcoRIにてベクターより切り出し、0.8%アガロース・ゲル中で電気泳動を行い、エチジウムブロマイド (日本ジーン社製) にて染色後、紫外線下で観察し、約700bpのバンドをゲルから切り出してGENECLEAN II Kit (フナコシ社製) を用いて精製した。得られたDNA断片をDNAラベリングキット (Megaprime DNA labeling system: Amersham社製コードRPN1607) を用いて標識した。すなわち、DNA100ngにプライマー液10 μ l、5×反応緩衝溶液20 μ l及び脱イオン水を加えて全量を86 μ lとして沸騰水浴を5分間行い、その後、 α -³²P-dCTP (アマーシャム社製、コードAA 0005) 10 μ l、及びKlenow酵素溶液4 μ lを加えて、37℃で10分間水浴し、放射標識したC5L2断片を合成した。更にその後、セファデックスカラム (Quick

Spin Column Sephadex G-50: 独逸国ベーリンガーマンハイム社製) で精製し、5分間沸騰水浴をしたのち、2分間氷冷後使用した。

【0048】

前述の方法にて作成したフィルターを、各々の成分の最終濃度が6倍濃度のSSC溶液、5倍濃度のデンハルト液(和光純薬社製)、0.5% SDS(ドデシル硫酸ナトリウム、和光純薬社製)、及び100 μ g/mlの沸騰水浴により変性したサケ精子DNA(Sigma社製)を含むハイブリダイゼーション液中に浸し、65℃にて2時間振とうしたのち、前述の方法で³²P標識されたプローブをハイブリダイゼーション液に添加し、65℃にて16時間振とうし、ハイブリダイゼーションを行った。

【0049】

次に、フィルターを0.1% SDSを含む、各々の成分の最終濃度が2倍濃度のSSC溶液に浸し、室温で3回洗浄後、さらに同溶液で室温で15分間洗浄した。洗浄を終了したフィルターを増感スクリーンを使用して、-85℃でオートラジオグラフィーを行った。その結果、強く露光された部分のクローンを拾い、再度ブランクを蒔き直し前述の方法にてスクリーニングを行い、完全に単独のクローンを分離した。

【0050】

単離されたファージクローンのうち2クローンを以降の遺伝子配列決定に供した。Molecular Cloning, A laboratory manual (1989, Eds., Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., Cold Spring Harbor Laboratory Press) の2.70の方法に従い、これらのすべてのクローンのファージを約10⁹ pfu (plaque forming unit) 調製し、Wizard lambda preps (Promega) を用いてファージDNAを精製し、制限酵素EcoRIにて消化し、同様に制限酵素EcoRIで消化したプラスミドpBluescript II KS(+) (Stratagene社製) に組み込んだ。これらのクローンのDNA配列をDNAシーケンサーにより解析し、配列表配列番号3に示す塩基配列を決定

した。配列表配列番号2は、配列表配列番号3のうちC5L2のタンパク質をコードしている部分の塩基配列である。このC5L2の蛋白質をコードしているDNAを含むプラスミドをpBSC5L2と命名した。

【0051】

【参考例3】

Northern Blottingによる解析

参考例1, 2で得られたヒト7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2の各臓器におけるmRNA発現をNorthern Blottingで解析した。Multiple Tissue Northern (MTN) Blotsフィルター (CLONTECH社製、コード#7757-1、#7759-1、#7760-1及び#7767-1)を用い、5倍濃度のSSPE溶液(1倍濃度のSSPE溶液は0.15M NaCl, 10mM NaH₂PO₄, 1mM EDTA, pH7.4)、10倍濃度のデンハルト液(和光純薬社製)、2%SDS(ドデシル硫酸ナトリウム、和光純薬社製)、終濃度50%ホルムアミド(和光純薬社製)、及び沸騰水浴により変性したサケ精子DNA(100μg/ml; Sigma社製)を含むハイブリダイゼーション液中に浸し、50℃にて2時間振とうした後、実施例2と同様の方法で³²P標識されたC5L2遺伝子の3'末端側のNaeI-EcoRI断片プローブをハイブリダイゼーション液に添加し、50℃にて16時間振とうし、ハイブリダイゼーションを行った。

【0052】

次に、フィルターを、0.1%SDSを含む、各々の成分の最終濃度が0.1倍濃度のSSC溶液中で、50℃ 20分間2回、60℃ 20分間1回洗浄した。洗浄後のフィルターを増感スクリーンを使用して、-85℃でオートラジオグラフィーを行った。その結果、末梢血白血球及び脾臓で約2.4Kbに非常に強いバンドが検出された。また、骨髄、リンパ節、脊髄、腎臓、肝臓、肺、胎盤、心臓でも弱い発現が確認された。ややサイズの大きい強いバンドが末梢血白血球、脾臓、精巣で確認された。脳、骨格筋、膵臓、胸腺、前立腺、胃、甲状腺、気管、副腎、胎児脳、胎児肺、胎児肝、胎児腎臓では、検出されなかった。

【0053】

未成熟樹状細胞でもこのバンドが検出されたが、成熟した樹状細胞ではバンドが検出されなかった。このことから、成熟することによって、C5L2の発現が消失することが示された。

【0054】

【参考例4】

7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2発現ベクターの作製

参考例2で単離されたC5L2全長遺伝子を含むプラスミドクローンを鋳型としてC5L2遺伝子のPCR (polymerase chain reaction) を行った。PCRにはHigh Fidelity Taqポリメラーゼ (ベーリンガーマンハイム社製) を用いた。このプラスミド溶液1 μ l (DNA 5 ngを含む) に脱イオン水37.5 μ l、Taqポリメラーゼ0.5 μ lと、Taqポリメラーゼに添付のバッファー5 μ lと、2.5 mM dNTP mixture (宝酒造社製) 4 μ lと、配列表配列番号7に示したオリゴヌクレオチド (配列表配列番号2の塩基配列の1番目のAから22番目のTの22塩基配列の5'末端にスペーサー配列GGGGと制限酵素HindIIIの酵素配列AGCTTを加えたもの)、および配列表配列番号8に示したオリゴヌクレオチド (配列表配列番号4の塩基配列の206番目のCから225番目のAの20塩基配列の5'末端にスペーサー配列GGGAと制限酵素SacIIの酵素配列CCGGCを加えたもの) を、それぞれ20ピコモル加え、最終容量50 μ lとした。

【0055】

この混合物を、TaKaRa PCR thermal Cycler 480を用いて、96℃1分、60℃1分、72℃2分を20サイクル行ったのち、72℃7分の反応を行った。このPCR産物の一部を0.8%アガロース・ゲル中で電気泳動を行い、エチジウムブロマイド (日本ジーン社製) にて染色後、紫外線下で観察し、約1150 bpのcDNAが増幅されていることを確認した。このPCR反応溶液を、常法に従い、フェノール・クロロホルム処理してエタノール沈殿した。遠心してDNAを回収した後、蒸留水にて溶解し、制限酵素HindIII、SacIIで順次消化した。その後、消化した反応液を0.8%アガロ

ースゲル上で分離し、目的とする遺伝子産物をゲルから切り出し、GENECL
EAN IIを用いて、DNAの精製を行った。

【0056】

この精製DNAを、上述と同様な方法で、制限酵素HindIII、SacIIで
消化、精製したpcDNA3.1/Myc-His(+)Bとライゲーションキ
ットver2(宝酒造社製)により連結して、大腸菌DH5コンピテントセル(宝酒造社製)に遺伝子導入した。アンピシリン(Sigma社製)を50μg/ml含むL-Broth(宝酒造社製)半固型培地のプレートに菌を蒔き、12時間程度37℃に放置し、現れてきたコロニーを無作為選択し、同濃度のアンピシリンを含むL-Broth液体培地2mlに植え付け、18時間程度37℃で振とう培養後、菌体を回収し、ウィザードミニプレップ(Promega社製)を用いて添付の説明書に従ってプラスミドを分離した。このプラスミドを制限酵素HindIII、SacIIにて消化し、約1150bpのDNAが切り出されたクローンについて、組み込まれているDNAの塩基配列決定を行い、C5L2の発現ベクター、pcDNAC5L2を得た。

【0057】

なお、このプラスミドpcDNAC5L2を大腸菌DH5に導入した菌株E.
coli:DH5-pcDNAC5L2は、日本国通商産業省工業技術院生命工
学工業技術研究所に平成10年9月1日に受託番号:FERM P-16976
として寄託されている。

【0058】

【実施例】

慢性関節リウマチ(RA)患者末梢血でのC5L2遺伝子の発現

(1) PBMC、顆粒球の調製

末梢血の血液細胞分画は、次のように行った。最終濃度20U/mlとなるようにヘパリンを添加したヒト末梢血10mlを、無血清RPMI1640培地(RPMI-0)で3倍に希釈した。あらかじめFicoll-Paque(ファルマシア社)10mlを入れた50ml遠心管に希釈した血液を重層し、遠心機のブレーキを解除した状態で、20℃、400xgで40分遠心した。末梢

血単核球 (PBMC) は上層とフィコール層の境目にバンディングし、顆粒球は赤血球と共に遠心管の底に沈殿した。PBMC層をパスツールピペットで回収した後、上層とフィコール層を吸引除去して、沈殿した赤血球、顆粒球のみとした。

【0059】

回収したPBMC層をRPMI-0で2倍以上に希釈して、4℃、250 x g、5分遠心して細胞を集め、これをPBMCとした。

また、赤血球と顆粒球を含む画分には、RPMI-0を加えて全容量を10mlにした。これに、0.9% NaClで調製した3% dextran T-500溶液10ml (室温)を加えて良く混和し、室温で30分ほど静置して赤血球を沈殿させた。上層の顆粒球画分を回収して、4℃、250 x gで8分遠心して細胞を集めた。細胞ペレットを良くほぐした後、冷えた0.2% NaCl溶液を7ml加えて良く混和して溶血させた。30秒後、冷えた1.6% NaCl溶液を7ml加えて混和し、等張に戻した後、4℃、250 x gで8分遠心して細胞を集めた。これを顆粒球とした。

【0060】

PBMCと顆粒球の純度は、Flow Cytometerで検定した。細胞染色は、まず $5-10 \times 10^4$ 個の細胞を1.5mlのチューブに取り、1% BSA/PBSに懸濁して遠心洗浄した。沈殿した細胞画分に、1% BSA/PBSで20倍に希釈した標識抗体を加え、4℃、30分反応した。標識抗体には、FITC標識抗ヒトCD3抗体 (クローン HIT3a; Cat. No. 30114X、Pharmingen社)、PE標識抗ヒトCD19抗体 (クローン HIB19; Cat. No. 30655X、Pharmingen社)、FITC標識抗ヒトCD14抗体 (クローン M5E2; Cat. No. 30544X、Pharmingen社)、FITC標識抗CD66b抗体 (クローン G10F5; Cat. No. 33734X、Pharmingen社)を使用した。反応後、細胞を1% BSA/PBSで遠心洗浄し、30μmのナイロンメッシュに通して、Becton Dickinson社製FACS Caliberで測定した。

【0061】

(2) RNAの調製

このようにして調製したPBMCと顆粒球から、次のような方法でRNAを抽出した。

$5-10 \times 10^6$ 個の細胞を1.5mlチューブに取り、PBS(-) 0.5mlに細胞を懸濁後、細胞をスピンドウンして上清を捨てた。この操作を計2回行なった。最後の洗浄後は、できるだけPBS(-)を除いた。4M GITC溶液(4M guanidine isothiocyanate, 25mM sodium citrate (pH7), 0.5% sodium N-lauroyl sarcosinate) 400 μ lとメルカプトエタノール2 μ lを加え、室温にて10分攪拌した。20Gの注射針を付けた1mlのシリンジを用い、GITC溶液を4回出し入れしてゲノムDNAを剪断した。ここで操作を中断する場合は、サンプルを-80℃で凍結保存した。

【0062】

次に、40 μ lの2M sodium acetate (pH4.2)を加えて良く混和し、更に440 μ lの水飽和フェノールを加えて良く混和した。120 μ lのchloroform:isoamyl alcohol (24:1)を加えて良く混和した後、氷中に5分放置した。マイクロ遠心機にて4℃, 14000rpmで20分遠心した後、上層を300 μ lほど取って新しいチューブに移した。同容量の2-プロパノールを加えて混和した後、-80℃に30-60分放置した。チューブを取り出し、氷中にてサンプルを溶かした後、マイクロ遠心機にて4℃, 14000rpmで30分遠心した。上清を捨て、70%エタノール1mlを加えてマイクロ遠心機にて4℃, 14000rpmで5分遠心後、上清を捨てた。

【0063】

更に、これを後2回繰り返した。最後の遠心後は上清をできるだけ除き、得られたRNAペレットを風乾させた。10-20 μ lの水をチューブに加え、65℃の温浴槽で1-2分加温して溶解した後、氷中に移した。得られたRNA溶液の濃度を分光光度計にて測定した。

細胞より抽出したRNAには、ゲノムDNAが混入している可能性があった。そこで、得られたRNAをdeoxyribonuclease (DNase) 処理した。DNase処理はGibco BRL社製DNase I, Amplification Grade (Cat. No. 18068-015) を用い、添付のプロトコールに従って行った。まず、1 μ gのRNAを含む水8 μ lに1 μ lの10x DNase I Reaction Bufferと1 μ lのDNase I, Amplification Gradeを加えて混和した後、室温で15分反応させた。25mM EDTAを1 μ l加えて反応を停止後、10 μ lの水飽和フェノールを加えて良く混和した。3 μ lのchloroform:isoamylalcohol (24:1)を加えて良く混和後、氷中に5分放置した。マイクロ遠心機にて4℃、14000 rpmで10分遠心。上層(水層)を回収して新しいチューブに移した。

【0064】

1/10容量の3M sodium acetate (pH4.2)と2.5-3倍容量のエタノールを加えて良く混和し、-80℃に30-60分放置した。チューブを取り出し、マイクロ遠心機にて4℃、14000 rpmで10分遠心後、上清を捨てた。500 μ lの70%エタノールを加えてマイクロ遠心機にて4℃、14000 rpmで3分遠心後、上清を捨てた。これをもう1回繰り返した。最後の遠心後は上清をできるだけ除き、得られたRNAペレットを風乾させた。10-20 μ lの水をチューブに加え、65℃の温浴槽で1-2分加温して溶解させた後、氷中に移した。得られたRNA溶液の濃度を分光光度計にて測定した。

【0065】

(3) RT-PCR法

このようにして調製したRNAから、次のような逆転写反応でcDNAを合成した。逆転写反応はGibco BRL社製のSUPERScript™ II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (Cat. No. 18064-014)を用い、添付のプロトコールに従って行った。1-5 μ gのRNAを含む水7 μ lにOligo (dT)₁₂₋₁₈ (0.5mg/

ml) 1 μ lを加え、良く混和した後、70℃の温浴槽で10分加温した。氷中に移して急冷後、内容物をスピンドウンした。4 μ lの5x First Strand Buffer、2 μ lの0.1M DTT、10mMのdATP、dGTP、dCTP、dTTPをそれぞれ1 μ l、Promega社製Recombinant RNasin^R (Cat. No. N2511)を1 μ l、SUPERSCRIPTTM IIを1 μ l加えて混和後、42℃で50分反応させた。70℃の温浴槽で15分加温して酵素を失活させて、cDNA合成を完了した。

【0066】

PCR反応はPERKIN ELMER社製のGeneAmp^R PCR Core Reagentsを用いて、添付のプロトコールに従って行った。RNA 15ng分の逆転写反応産物を含む水21.3 μ lに10x PCR Bufferを3 μ l、25mM MgCl₂を2.4 μ l、10mMのdATP、dGTP、dCTP、dTTPをそれぞれ0.6 μ lずつ、20 μ Mの5'プライマーと3'プライマーをそれぞれ0.3 μ lずつ、CLONTECH社製TaqStartTM Antibodyを0.15 μ l、Ampli Taq^R DNA Polymeraseを0.15 μ l加え、よく混ぜた。各遺伝子の増幅に用いたプライマーの配列を配列表配列番号9から12に示した。宝酒造株式会社製TaKaRa PCR Thermal Cycler 480を用いて、94℃、2分の変性ステップの後、94℃、45秒、60℃、45秒、72℃、2分を1サイクルとして30サイクルの増幅反応を行った。

【0067】

最終サイクルのあとに72℃、7分の伸長反応を行い、その後4℃まで冷却してPCR反応を終了させた。PCR反応液10 μ lを、2%アガロースゲルを用いて50Vで約50分ほど電気泳動した後、0.5 μ g/mlのエチジウムブロミド溶液で20分染色した。ゲルを水に移して15分間の脱染色を2回行った後、Bio Image社製Gel Print 2000i/VGAを用いて電気泳動画像を取り込み、画像解析ソフトBasic Quantifierで各遺伝子のPCR産物量を数値化し、同一サンプル中のG3PDH遺伝子のPCR

産物量を100%とした相対値で各遺伝子のPCR産物量を表した。PCRは2回行い、その平均値を解析に用いた。

【0068】

(4) 健常人の解析

上記の手法を用いて、まず健常人ボランティア8例から調製したPBMCと顆粒球におけるC5L2の発現を調べた。Flow Cytometerによる細胞純度検定では、顆粒球画分のCD66b陽性細胞の割合は、 $90.5 \pm 3.2\%$ (平均 \pm SE)で、PBMC画分におけるCD66b陽性細胞の割合は、 $4.1 \pm 0.9\%$ であった。顆粒球におけるC5L2の発現は $73.4 \pm 17.8\%$ 、PBMCにおけるC5L2の発現は $0.5 \pm 0.5\%$ で、C5L2が主に顆粒球で発現していることが判明した ($p \leq 0.01$) (表1)。

【0069】

【表1】

健常人末梢血由来単核球・顆粒球画分におけるC5L2の発現量

	単核球	顆粒球
C5L2発現量 a)	0.5 ± 0.5	73.4 ± 17.8
CD66b陽性 b)	4.1 ± 0.9	90.5 ± 3.2

平均値 \pm S. E. a) %G3PDH b) FACS解析 (%)

【0070】

(5) 採血後の時間変化

次に、採血後のC5L2の発現変化を調べた。健常人ボランティア8例で、採血後直ちに顆粒球を調製した場合と、採血後1晩放置してから顆粒球を調製した場合のC5L2の発現を比較した。新鮮血から調製した顆粒球での発現は $73.4 \pm 17.8\%$ 、保存血から調製した顆粒球での発現は $10.8 \pm 3.1\%$ で、C5L2の発現は経時的に減少することが明らかとなった ($p \leq 0.01$) (表

2)。そこでさらに、健常人ボランティア3例について採血直後、6時間後、24時間後に末梢血から調製した顆粒球について同様にC5L2の発現量を測定した結果、採血後6時間の間に発現量は急激に減少すること、その後24時間後まで減少を続けるがその変化ははじめの6時間と比較すると緩やかなことがわかった(図1)。(平均値 採血直後71.7% 6時間後31.1% 24時間後10.6%)

【0071】

(6) RA患者の解析

次に、RA患者8例の新鮮血からPBMCおよび顆粒球を調製し、C5L2の発現量を比較した。その結果、PBMC画分ではほとんど発現しておらず(0.0±0.0%)、顆粒球画分でのみ発現が認められ(44.7±4.7%)、RA患者においても健常人同様、C5L2が顆粒球画分で発現していることが明らかになった($p \leq 0.01$)。このときのCD66b陽性細胞の割合は、PBMC画分では3.3±2.2%、顆粒球画分では80.9±5.8%であった(表2)。

【0072】

ついで、RA患者8例の新鮮血および12例の1晩保存血から調製した顆粒球でのC5L2の発現を解析し、健常人ボランティア8例の新鮮血および1晩保存血の解析結果と比較した。その結果、RA患者の新鮮血から調製した顆粒球での発現は44.7±4.7%、RA患者保存血から調製した顆粒球での発現は42.8±6.9%で、RA患者顆粒球でのC5L2の発現は、健常人とは異なり経時的に減少せず、発現が維持されることが明らかとなった。1晩保存血から調製した顆粒球でのC5L2の発現量は健常人で10.8±3.1%であったのに対して、RA患者では42.8±6.9%であり、維持されたRA患者における保存後の発現量は健常人よりも有意に高い($p \leq 0.001$)ことが認められた(表3)。

【0073】

【表2】

RA患者末梢血由来単核球・顆粒球画分におけるC5L2の発現量

	単核球	顆粒球
C5L2発現量 a)	0.0 ± 0.0	44.7 ± 4.7
CD66b陽性 b)	3.3 ± 2.2	80.9 ± 5.8

平均値 ± S. E. a) %G3PDH b) FACS解析 (%)

【0074】

【表3】

健常人およびRA患者における末梢血由来顆粒球中でのC5L2発現量の保存による変化

	新鮮血	24時間保存血
健常人顆粒球	73.4 ± 17.8	10.8 ± 3.1
RA患者顆粒球	44.7 ± 4.7	42.8 ± 6.9

%G3PDH 平均値 ± S. E.

【0075】

更に、RA患者の新鮮血のC5L2発現とリウマトイド因子の値との間には、有意な正の相関関係が得られ（相関係数 $R = 0.846$ 、 $p \leq 0.01$ ）、C5L2の発現がリウマチの診断に有用であることが示された（図2）。

【0076】

【発明の効果】

本発明により、7回膜貫通型受容体蛋白質C5L2発現量が炎症性疾患、特に

慢性関節リウマチの診断に使用可能となった。

【0077】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Asahi Chemical Industry Co., Ltd.

<120> 新規受容体蛋白C5L2の測定方法

<130> X11-00077

<160> 12

<210> 1

<211> 337

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gly Asn Asp Ser Val Ser Tyr Glu Tyr Gly Asp Tyr Ser Asp Leu

1 5 10 15

Ser Asp Arg Pro Val Asp Cys Leu Asp Gly Ala Cys Leu Ala Ile Asp

20 25 30

Pro Leu Arg Val Ala Pro Leu Pro Leu Tyr Ala Ala Ile Phe Leu Val

35 40 45

Gly Val Pro Gly Asn Ala Met Val Ala Trp Val Ala Gly Lys Val Ala

50 55 60

Arg Arg Arg Val Gly Ala Thr Trp Leu Leu His Leu Ala Val Ala Asp

65 70 75 80

特平 1 1 - 0 7 0 8 0 0

Leu Leu Cys Cys Leu Ser Leu Pro Ile Leu Ala Val Pro Ile Ala Arg

85

90

95

Gly Gly His Trp Pro Tyr Gly Ala Val Gly Cys Arg Ala Leu Pro Ser

100

105

110

Ile Ile Leu Leu Thr Met Tyr Ala Ser Val Leu Leu Leu Ala Ala Leu

115

120

125

Ser Ala Asp Leu Cys Phe Leu Ala Leu Gly Pro Ala Trp Trp Ser Thr
 130 135 140
 Val Gln Arg Ala Cys Gly Val Gln Val Ala Cys Gly Ala Ala Trp Thr
 145 150 155 160
 Leu Ala Leu Leu Leu Thr Val Pro Ser Ala Ile Tyr Arg Arg Leu His
 165 170 175
 Gln Glu His Phe Pro Ala Arg Leu Gln Cys Val Val Asp Tyr Gly Gly
 180 185 190
 Ser Ser Ser Thr Glu Asn Ala Val Thr Ala Ile Arg Phe Leu Phe Gly
 195 200 205
 Phe Leu Gly Pro Leu Val Ala Val Ala Ser Cys His Ser Ala Leu Leu
 210 215 220
 Cys Trp Ala Ala Arg Arg Cys Arg Pro Leu Gly Thr Ala Ile Val Val
 225 230 235 240
 Gly Phe Phe Val Cys Trp Ala Pro Tyr His Leu Leu Gly Leu Val Leu
 245 250 255
 Thr Val Ala Ala Pro Asn Ser Ala Leu Leu Ala Arg Ala Leu Arg Ala
 260 265 270
 Glu Pro Leu Ile Val Gly Leu Ala Leu Ala His Ser Cys Leu Asn Pro
 275 280 285
 Met Leu Phe Leu Tyr Phe Gly Arg Ala Gln Leu Arg Arg Ser Leu Pro
 290 295 300
 Ala Ala Cys His Trp Ala Leu Arg Glu Ser Gln Gly Gln Asp Glu Ser
 305 310 315 320
 Val Asp Ser Lys Lys Ser Thr Ser His Asp Leu Val Ser Glu Met Glu
 325 330 335
 Val

【 0 0 7 8 】

<210> 2

<211> 1014

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(1011)

<400> 2

atg ggg aac gat tct gtc agc tac gag tat ggg gat tac agc gac ctc	48
Met Gly Asn Asp Ser Val Ser Tyr Glu Tyr Gly Asp Tyr Ser Asp Leu	
1 5 10 15	
tgc gac cgc cct gtg gac tgc ctg gat ggc gcc tgc ctg gcc atc gac	96
Ser Asp Arg Pro Val Asp Cys Leu Asp Gly Ala Cys Leu Ala Ile Asp	
20 25 30	
ccg ctg cgc gtg gcc ccg ctc cca ctg tat gcc gcc atc ttc ctg gtg	144
Pro Leu Arg Val Ala Pro Leu Pro Leu Tyr Ala Ala Ile Phe Leu Val	
35 40 45	
ggg gtg ccg ggc aat gcc atg gtg gcc tgg gtg gct ggg aag gtg gcc	192
Gly Val Pro Gly Asn Ala Met Val Ala Trp Val Ala Gly Lys Val Ala	
50 55 60	
cgc cgg agg gtg ggt gcc acc tgg ttg ctc cac ctg gcc gtg gcg gat	240
Arg Arg Arg Val Gly Ala Thr Trp Leu Leu His Leu Ala Val Ala Asp	
65 70 75 80	
ttg ctg tgc tgt ttg tct ctg ccc atc ctg gca gtg ccc att gcc cgt	288
Leu Leu Cys Cys Leu Ser Leu Pro Ile Leu Ala Val Pro Ile Ala Arg	
85 90 95	
gga ggc cac tgg ccg tat ggt gca gtg ggc tgt cgg gcg ctg ccc tcc	336

Gly Gly His Trp Pro Tyr Gly Ala Val Gly Cys Arg Ala Leu Pro Ser	
100 105 110	
atc atc ctg ctg acc atg tat gcc agc gtc ctg ctc ctg gca gct ctc	384
Ile Ile Leu Leu Thr Met Tyr Ala Ser Val Leu Leu Leu Ala Ala Leu	
115 120 125	
agt gcc gac ctc tgc ttc ctg gct ctc ggg cct gcc tgg tgg tct acg	432
Ser Ala Asp Leu Cys Phe Leu Ala Leu Gly Pro Ala Trp Trp Ser Thr	
130 135 140	
gtt cag cgg gcg tgc ggg gtg cag gtg gcc tgt ggg gca gcc tgg aca	480
Val Gln Arg Ala Cys Gly Val Gln Val Ala Cys Gly Ala Ala Trp Thr	
145 150 155 160	
ctg gcc ttg ctg ctc acc gtg ccc tcc gcc atc tac cgc cgg ctg cac	528
Leu Ala Leu Leu Leu Thr Val Pro Ser Ala Ile Tyr Arg Arg Leu His	
165 170 175	
cag gag cac ttc cca gcc cgg ctg cag tgt gtg gtg gac tac ggc ggc	576
Gln Glu His Phe Pro Ala Arg Leu Gln Cys Val Val Asp Tyr Gly Gly	
180 185 190	
tcc tcc agc acc gag aat gcg gtg act gcc atc cgg ttt ctt ttt ggc	624
Ser Ser Ser Thr Glu Asn Ala Val Thr Ala Ile Arg Phe Leu Phe Gly	
195 200 205	
ttc ctg ggg ccc ctg gtg gcc gtg gcc agc tgc cac agt gcc ctc ctg	672
Phe Leu Gly Pro Leu Val Ala Val Ala Ser Cys His Ser Ala Leu Leu	
210 215 220	
tgc tgg gca gcc cga cgc tgc cgg ccg ctg ggc aca gcc att gtg gtg	720
Cys Trp Ala Ala Arg Arg Cys Arg Pro Leu Gly Thr Ala Ile Val Val	
225 230 235 240	
ggg ttt ttt gtc tgc tgg gca ccc tac cac ctg ctg ggg ctg gtg ctc	768
Gly Phe Phe Val Cys Trp Ala Pro Tyr His Leu Leu Gly Leu Val Leu	
245 250 255	

act gtg gcg gcc ccg aac tcc gca ctc ctg gcc agg gcc ctg cgg gct 816
 Thr Val Ala Ala Pro Asn Ser Ala Leu Leu Ala Arg Ala Leu Arg Ala
 260 265 270
 gaa ccc ctc atc gtg ggc ctt gcc ctc gct cac agc tgc ctc aat ccc 864
 Glu Pro Leu Ile Val Gly Leu Ala Leu Ala His Ser Cys Leu Asn Pro
 275 280 285
 atg ctc ttc ctg tat ttt ggg agg gct caa ctc cgc cgg tca ctg cca 912
 Met Leu Phe Leu Tyr Phe Gly Arg Ala Gln Leu Arg Arg Ser Leu Pro
 290 295 300
 gct gcc tgt cac tgg gcc ctg agg gag tcc cag ggc cag gac gaa agt 960
 Ala Ala Cys His Trp Ala Leu Arg Glu Ser Gln Gly Gln Asp Glu Ser
 305 310 315 320
 gtg gac agc aag aaa tcc acc agc cat gac ctg gtc tcg gag atg gag 1008
 Val Asp Ser Lys Lys Ser Thr Ser His Asp Leu Val Ser Glu Met Glu
 325 330 335
 gtg tag 1014
 Val

【 0 0 7 9 】

<210> 3

<211> 1287

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

cctgtgtgcc acgtgctgga caaatcttaa ctccctcaagg actcccaaaa ccagagacac 60
 caggagcctg aatggggaac gattctgtca gctacgagta tggggattac agcgacctct 120
 cggaccgccc tgtggactgc ctggatggcg cctgcctggc catcgaccgc ctgcgcgtgg 180
 ccccgctccc actgtatgcc gccatcttcc tgggtgggggt gccgggcaat gccatggtgg 240

cctgggtggc tgggaaggtg gcccgccgga ggggtgggtgc cacctggttg ctccacctgg 300
 ccgtggcgga tttgctgtgc tgtttgtctc tgcccatcct ggcagtgcc attgcccgtg 360
 gaggccactg gccgtatggt gcagtgggct gtcgggcgct gccctccatc atcctgctga 420
 ccatgtatgc cagcgtcctg ctccctggcag ctctcagtgc cgacctctgc ttcctggctc 480
 tcgggcctgc ctggtggtct acggttcagc gggcgtgcgg ggtgcaggtg gcctgtgggg 540
 cagcctggac actggccttg ctgtcaccg tgccctccgc catctaccgc cggctgcacc 600
 aggagcactt cccagcccgg ctgcagtgtg tgggtggacta cggcggctcc tccagcaccg 660
 agaatcggt gactgccatc cggtttcttt ttggtttcct ggggccctg gtggccgtgg 720
 ccagctgcca cagtgccctc ctgtgctggg cagcccgcg ctgccggccg ctgggcacag 780
 ccattgtggt ggggtttttt gtctgctggg caccctacca cctgctgggg ctggtgtca 840
 ctgtggcggc cccgaactcc gcactcctgg ccagggccct gcgggctgaa cccctcatcg 900
 tgggccttgc cctcgctcac agctgcctca atcccatgct cttcctgtat tttgggaggg 960
 ctcaactccg ccggtcactg ccagctgcct gtcactgggc cctgaggag tcccagggcc 1020
 aggacgaaag tgggacagc aagaaatcca ccagccatga cctggtctcg gagatggagg 1080
 tgtaggctgg agagacattg tgggtgtgta tcttcttate tcatttcaca agactggctt 1140
 caggcatagc tggatccagg agctcaatga tgtcttcatt ttattccttc cttcattcaa 1200
 cagatatcca tcatgcactt gctatgtgca aggccttttt aggcactaga gatatagcag 1260
 tgaccaaaac agacacaaat cctgccc 1287

<210> 4

<211> 1287

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

gggcaggatt tgtgtctgtt ttggtcactg ctatatctct agtgcctaaa aaggccttgc 60
 acatagcaag tgcatgatgg atatctgttg aatgaaggaa ggaataaaat gaagacatca 120
 ttgagctcct ggatccagct atgcctgaag ccagtcttgt gaaatgagat aagaagatac 180
 acacccacaa tgtctctcca gcctacacct ccattctccga gaccaggtca tggctggttg 240

```

atttcttgct gtccacactt tcgtcctggc cctgggactc cctcagggcc cagtgcacagg 300
cagctggcag tgaccggcgg agttgagccc tcccaaaata caggaagagc atgggattga 360
ggcagctgtg agcgagggca agggccacga tgaggggttc agcccgcagg gccctggcca 420
ggagtgcgga gttcggggcc gccacagtga gcaccagccc cagcaggtgg tagggtgccc 480
agcagacaaa aaaccccacc acaatggctg tgcccagcgg ccggcagcgt cgggctgccc 540
agcacaggag ggcactgtgg cagctggcca cggccaccag gggccccagg aagccaaaaa 600
gaaaccggat ggcagtcacc gcattctcgg tgctggagga gccgccgtag tccaccacac 660
actgcagccg ggctgggaag tgctcctggt gcagccggcg gtagatggcg gagggcacgg 720
tgagcagcaa ggccagtgtc caggctgccc cacaggccac ctgcaccccg cagccccgct 780
gaaccgtaga ccaccaggca ggcccagag ccaggaagca gaggtcggca ctgagagctg 840
ccaggagcag gacgctggca tacatgggtc gcaggatgat ggagggcagc gcccgcacagc 900
ccactgcacc atacggccag tggcctccac gggcaatggg cactgccagg atgggcagag 960
acaaacagca cagcaaatcc gccacggcca ggtggagcaa ccaggtggca cccaccctcc 1020
ggcggggccac cttcccagcc acccaggcca ccatggcatt gcccggcacc cccaccagga 1080
agatggcggc atacagtggg agcggggcca cgcgcagcgg gtcgatggcc aggcaggcgc 1140
catccaggca gtccacaggg cggtcgcaga ggtcgcgtga atccccatac tcgtagctga 1200
cagaatcgtt cccattcag gctcctggtg tctctggtt tgggagtcct tgaggagtta 1260
agatttgtcc agcacgtggc acacagg 1287

```

【 0 0 8 0 】

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 1 8、2 2、2 4 残基めの n はイノシン / i を示す。

メラノーマの増殖に関与していると考えられる既知の 7 回膜貫通型受容体蛋白質の配列をもとにデザインした degenerative PCR 法のためのプライマー。

<400> 5

atcttaagct tgaacctngc cntngcdgac 30

<210> 6

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 2 2、2 8 残基めの n はイノシン/i を示す。

2 1 残基めの n は A または G または C または T を示す。

メラノーマの増殖に関与していると考えられる既知の 7 回膜貫通型受容体蛋白質の配列をもとにデザインした degenerative PCR 法のためのプライマー。

<400> 6

cccaacgaat tcrtagatsa nnggrttnav rca 33

<210> 7

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> C 5 L 2 の発現ベクターを構築する際の遺伝子増幅に用いた化学合成プライマー。配列表配列番号 2 の塩基配列の 1 番目の A から 2 2 番目の T の 2 2 塩基配列の 5' 末端に塩基 G G G G および制限酵素 H i n d I I I の酵素配列 A A G C T T を加えたもの。

<400> 7

ggggaagcctt atggggaacg attctgtcag ct 32

【 0 0 8 1 】

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> C 5 L 2 の発現ベクターを構築する際の遺伝子増幅に用いた化学合成プライマー。配列表配列番号 4 の塩基配列の 2 0 6 番目の C から 2 2 5 番目の A の 2 0 塩基配列の 5' 末端にスペーサー配列 G G G A と制限酵素 S a c II の酵素配列 C C G C G G を加えたもの。

<400> 8

gggaccgcgg cacctccatc tccgagacca 30

<210> 9

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> C 5 L 2 の R T - P C R で用いられた化学合成プライマー。

<400> 9

atcatcctgc tgaccatgta tgccag 26

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> C 5 L 2 の R T - P C R で用いられた化学合成プライマー。

<400> 10

aaccgatgg cagtcaccgc attct 25

<210> 11

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> G 3 P D H の R T - P C R で用いられた化学合成プライマー。

<400> 11

tgaaggtcgg agtcaacgga tttggt 26

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> G 3 P D H の R T - P C R で用いられた化学合成プライマー。

<400> 12

catgtgggcc atgaggtcca ccac

24

【図面の簡単な説明】

【図 1】

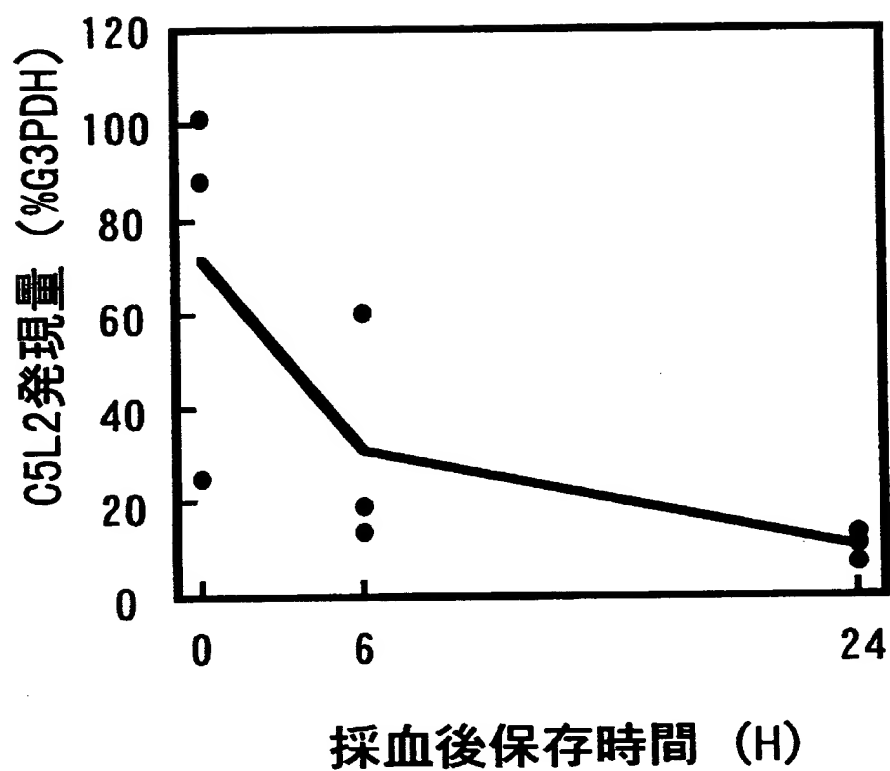
健康人ボランティア末梢血から調製した顆粒球を室温で保存したときの C 5 L 2 発現量の経時変化を表すグラフである。縦軸は C 5 L 2 発現量を示し、横軸は採血後の経過時間を示す。グラフ中、黒点は個々の値を示し、直線はその平均値をむすんだものである。

【図 2】

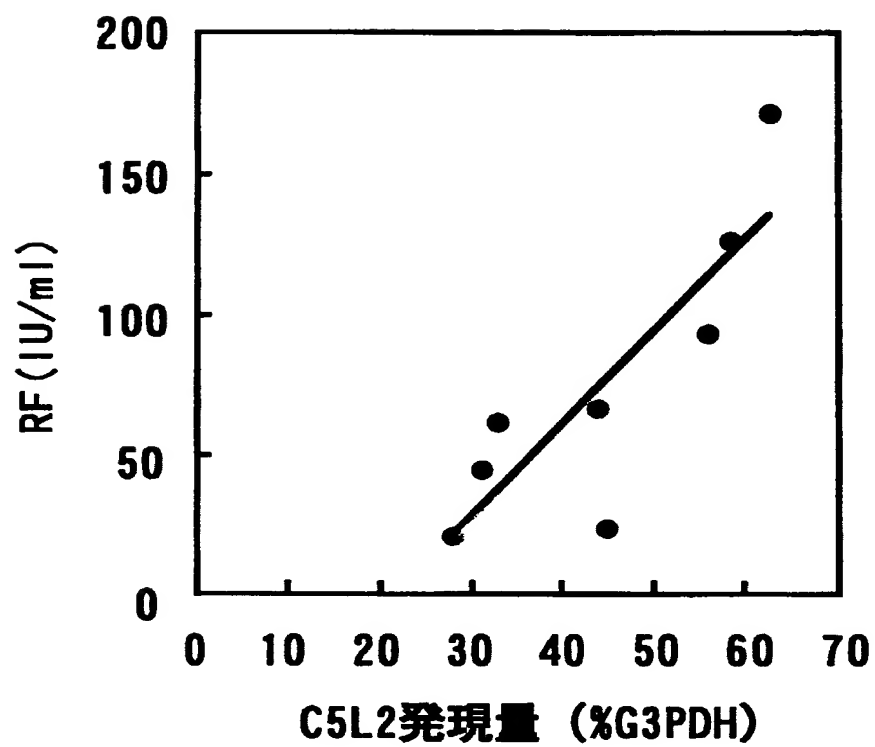
R A 患者新鮮血から調製した顆粒球中の C5L2 発現量とリウマトイド因子の相関を示すグラフ（散布図）である。縦軸はリウマトイド因子の値を示し、横軸は C 5 L 2 の発現量を示す。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 炎症性疾患の診断に有用な、蛋白質またはそれをコードする核酸の測定方法を提供すること。

【解決手段】 ヒト顆粒球中での 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C5L2 の発現量を、mRNA 量または蛋白質量により測定する。

【効果】 本発明の 7 回膜貫通型受容体蛋白質 C5L2 の発現量を測定することにより、慢性関節リウマチの診断が可能になる。

【選択図】 選択図なし

【書類名】 手続補足書

【整理番号】 X11-00077

【提出日】 平成11年 3月18日

【あて先】 特許庁長官 殿

【事件の表示】

 【出願番号】 平成11年特許願第 70800号

【補足をする者】

 【事件との関係】 特許出願人

 【識別番号】 000000033

 【氏名又は名称】 旭化成工業株式会社

 【代表者】 山本 一元

【補足対象書類名】 特許願

【補足の内容】 受託番号を証明する書面

【提出物件の目録】

 【物件名】 受託証 1

書式 7

19905200036



受 託 証

通知番号 : 10 生寄文 第 1153号

通知年月日 : 平成 10 年 9 月 1 日

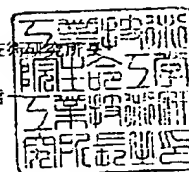
旭化成工業株式会社
代表取締役

山本 一弘

殿

工業技術院生命工学工業技術研究所

大答 信



1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) E. coli : DH5- ϕ cDNACSL2	(受託番号) FERM P- 16976
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1 桶の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。	
■ 科学的性質	
■ 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
当所は、平成 10 年 9 月 1 日に受領した 1 桶の微生物を受託する。	

認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第070800号
受付番号	19905200036
書類名	手続補足書
担当官	宮末 亨 8857
作成日	平成11年 5月25日

<認定情報・付加情報>

【補足をする者】	申請人
【識別番号】	000000033
【住所又は居所】	大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号
【氏名又は名称】	旭化成工業株式会社
【提出された物件の記事】	
【提出物件名】	受託証 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000000033]

1. 変更年月日 1990年 8月16日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号
氏 名 旭化成工業株式会社

